

13.10.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年10月 8日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-349772  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2003-349772]

出願人 サッポロビール株式会社  
Applicant(s): 栄研化学株式会社

BEST AVAILABLE COPY

REC'D 02 DEC 2004

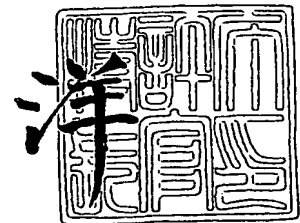
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2004-3104669

【書類名】 特許願  
【整理番号】 510-1386  
【提出日】 平成15年10月 8日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
C12Q 1/04  
C12Q 1/68

【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 価値創造フ  
ロンティア研究所内  
【氏名】 中北 保一

【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 価値創造フ  
ロンティア研究所内  
【氏名】 小川 雅裕

【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目 1 0 サッポロビール株式会社 価値創造フ  
ロンティア研究所内  
【氏名】 土屋 陽一

【特許出願人】  
【識別番号】 303040183  
【氏名又は名称】 サッポロビール株式会社

【特許出願人】  
【識別番号】 000120456  
【氏名又は名称】 栄研化学株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100088155  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】  
【識別番号】 100089978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】  
【識別番号】 100092657  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 014708  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子配列の81番から934番の核酸配列の一部またはその相補鎖から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、

(a) 第1のセグメントとして、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列と、

(b) 第2のセグメントとして、第1のセグメントの3'側の核酸配列に相補的であり、第1のセグメントの5'側に位置する塩基配列

を含むことを特徴とする、プライマー。

**【請求項 2】**

配列番号1～4で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス属菌検出用プライマーセット。

**【請求項 3】**

配列番号5～8で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。

**【請求項 4】**

配列番号9～13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。

**【請求項 5】**

検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、請求項1に記載のプライマーで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。

**【請求項 6】**

検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、請求項2に記載のプライマーセットで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。

**【請求項 7】**

検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、請求項3に記載のプライマーセットで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

**【請求項 8】**

検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、請求項4に記載のプライマーセットで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

**【請求項 9】**

検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、請求項1に記載のプライマーを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。

**【請求項 10】**

検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、請求項2に

記載のプライマーセットを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。

【請求項11】

検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、請求項3に記載のプライマーセットを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。

【請求項12】

検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、請求項4に記載のプライマーセットを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。

【請求項13】

~~請求項1～4のいずれか1つに記載のプライマーまたはプライマーセット、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPs、反応緩衝液を少なくとも含むことを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用キット。~~

## 【書類名】明細書

【発明の名称】アリサイクロバチラス属菌検出用プライマー

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、アリサイクロバチラス (*Alicyclobacillus*) 属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス (*Alicyclobacillus acidoterrestris*) 菌の16SrDNA遺伝子に特異的なプライマーに関する。さらに詳しくは、本発明は、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス属菌検出用プライマーまたはプライマーセットならびにアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセットに関する。さらに、本発明は、前記菌検出用プライマーまたはプライマーセットを等温遺伝子増幅法（以下、LAMP法という）に使用する、アリサイクロバチラス属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出・菌株の識別方法にも関する。

## 【背景技術】

【0002】

アリサイクロバチラス属菌は、好氣的に高温・酸性下で増殖する芽胞形成細菌であり、土壌や温泉等から分離されている。土壌中に存在するアリサイクロバチラス属が収獲果実に付着し、搾汁工程で果汁に入り込んだような場合、その果汁を使用した飲料水や食品の製造においては、製造工程で加熱殺菌が行われていたとしても、菌の耐熱性胞子が生き残り、製品中で発芽・増殖して変敗事故を引き起こす可能性のあることが知られている。特に、アリサイクロバチラス属菌のうち、グアヤコール臭という悪臭を出すアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌が、汚染事故の原因菌として報告されており、問題視されている。

【0003】

そこで、汚染事故を未然に防ぐために、アリサイクロバチラス属細菌の検出や識別の為に、微生物検査がなされており、幾つかの方法が提案されてきた。例えば、BAM培地（非特許文献1）やSemi合成培地（非特許文献2）などが検出培地として報告されているが、これらの培地組成は複雑で、また、検査結果を得るまでに数日を必要とするため、日々の微生物検査に使用するには問題がある。

【0004】

一方、菌種の識別法としては、生理・生化学的性状が菌種間であまり差がないこと、同一種内の菌株間で性状がばらつくことから、これらの性状のみで、種を識別することは難しい（非特許文献3）。

【0005】

そこで、遺伝子解析的手法を用いた識別法が提案されてきた。例えば、PCR法を用いた方法（特許文献1、非特許文献4）、RAPD法を用いた方法（非特許文献5）、16SrDNA配列の比較による方法（非特許文献6）などであるが、何れの場合も、高価な機器を必要とし、また、煩雑な操作を伴うため、日々の微生物検査に使用するには問題がある。

【特許文献1】国際特許公開W0 01/68914号パンフレット

【非特許文献1】G.Deinhard et al., System. Appl. Microbiol., 10, 47-53, 1987

【非特許文献2】B.Hippchen et al., Arch. Microbiol., 129, 53-55, 1981

【非特許文献3】後藤, J. Antibact. Antifung. Agents., 28(8), 499-508, 2000

【非特許文献4】K.Yamazaki et al., Lett. Appl. Microbiol., 23, 350-354, 1996

【非特許文献5】K.Yamazaki et al., Biosci. Biotech. Biochem., 61(6), 1016-1018, 1997

【非特許文献6】K.Goto et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 48, 243-250, 2002

## 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記の問題点に鑑み、従来技術の手法とは別の観点から、簡便で、迅速なアリサイクロバチラス属菌（特に、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌）の検出法および識別法の開発が望まれている。したがって、本発明の目的は、前記の課題を解決し、飲料や果汁などの食品検体中、アリサイクロバチラス属菌の有無について、簡便で、迅速な検出・識別法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、かかる課題を解決するべく検討を重ね、等温の遺伝子増幅反応である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法（国際特許公開WO 00/28082号パンフレット）を利用することにより、アリサイクロバチラス属菌およびアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出、識別を簡便、迅速に行い得ることを見出した。

【0008】

すなわち、本発明はアリサイクロバチラス属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子に特異的なプライマーを提供する。

【0009】

また、本発明によれば、被検アリサイクロバチラス属菌（好ましくは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌）の検出・識別方法であって、その菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、16SrDNA遺伝子に特異的なプライマーで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出・識別方法が提供される。

【0010】

より特定的には、本発明は、下記の（１）～（１３）に記載される、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーまたはプライマーセットおよびそれらを用いる、アリサイクロバチラス属菌、もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出・識別方法などを提供する。

（１）アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子配列の81番から934番の核酸配列の一部またはその相補鎖から選択される標的領域の塩基配列を増幅し、

（a）第１のセグメントとして、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子にアニールしてプライマーとして機能する塩基配列と、

（b）第２のセグメントとして、第１のセグメントの3'側の核酸配列に相補的であり、第１のセグメントの5'側に位置する塩基配列を含むことを特徴とする、プライマー。

（２）配列番号１～４で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス属菌検出用プライマーセット。

（３）配列番号５～８で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。

（４）配列番号９～１３で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなり、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅可能なアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用プライマーセット。

（５）検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、上記（１）に記載のプライマーで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。

（６）検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、上記（２）に記載のプライマーセットで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の検出方法。

（７）検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって

て、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、上記(3)に記載のプライマーセットで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

(8) 検体中に存在するアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法であって、該アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を標的とし、上記(4)に記載のプライマーセットで該16SrDNA遺伝子の特定領域を選択的に、LAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出方法。

(9) 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、上記(1)に記載のプライマーを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。

(10) 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、上記(2)に記載のプライマーセットを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌の識別方法。

(11) 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、上記(3)に記載のプライマーセットを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。

(12) 検体を増菌培養し、出現菌からDNA試料を分離し、該DNA試料に対して、上記(4)に記載のプライマーセットを用いて、LAMP法により増幅反応を行い、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅させ、この増幅産物の有無を確認することを特徴とする、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の識別方法。

(13) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のプライマーまたはプライマーセット、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPs、反応緩衝液を少なくとも含むことを特徴とする、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌検出用キット。

#### 【0011】

上記した(1)～(4)の所定のプライマーまたはプライマーセットをLAMP法に使用すると、アリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子の特定領域にアニールする。これをLAMP法で定める増幅条件のもとで、増幅すると特定の遺伝子領域が増幅される。このような増幅産物の有無は、電気泳動法または、簡易検出法によって確認する。このようにして、アリサイクロバチラス属菌が検出できる。上記した(3)または(4)の2組のプライマーセットは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌(16SrDNA遺伝子)に特異的であるので、アリサイクロバチラス属菌の中で、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス種の菌株のみを特異的に検出するから、これらのプライマーセットは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌とその他のアリサイクロバチラス属菌との識別にも使用できる。

#### 【0012】

また、本発明の検出方法を特定の検体(例えば、飲料試料)に適用するとき、検体から採取した雑菌を培養してDNA試料を分離し、このDNA試料に上記した(1)～(4)の所定のプライマーまたはプライマーセットを作用させ、同様に増幅されたDNA増幅産物の有無を確認する。このようにして、アリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌が検出できる。

#### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明は、配列番号1～4、5～8、または9～13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなるプライマーセットをLAMP法に使用して、アリサイクロバチラス属菌（好ましくは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌）の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅して、アリサイクロバチラス属菌の検出を可能にする。

#### 【0014】

また、本発明によるアリサイクロバチラス属菌の検出方法は、配列番号1～4、5～8、または9～13で表される核酸配列からなるオリゴヌクレオチドセットからなるプライマーセットを用いて、検体から得られたDNA試料にLAMP法（等温遺伝子増幅）を施し、増幅産物の有無を確認することからなるので、アリサイクロバチラス属菌（特に、有害アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌）の検出・識別を簡易、迅速かつ確実に行わしめる。

【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0015】

本発明は、果汁および果汁飲料等（集合的に飲料ともいう）を含む食品に、アリサイクロバチラス属菌や特に、~~アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌が存在するか否かを~~判定するために、前記細菌に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたLAMP法による等温遺伝子増幅により、菌の16SrDNA遺伝子の特定領域を増幅を行い、増幅産物の有無を確認することを基礎としている。

#### 【0016】

飲料工場では、果汁受入時や果汁飲料の微生物検査において、アリサイクロバチラス属菌の存在有無のチェックを行っている。一般的には、「耐熱性好酸性菌統一検査法」（果汁協会報、3月号、No.535、4-12、2003）に従って、飲料検体をメンブランフィルターで濾過し、菌を捕捉したメンブランフィルターをアリサイクロバチラス属用培地YSG寒天培地（酵母エキス：0.2%、グルコース：0.1%、可溶性デンプン：0.2%、寒天：1.5%、pH 4.0）に置き、45℃で3～5日培養する。出現してきた菌について、温度差法（判定に18～20時間が必要）やペルオキシダーゼ法（判定に1～3時間が必要）により、その菌がアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌であるか否かを判定している。

#### 【0017】

一方、メンブラン濾過が困難な検体の場合は、その検体をYSG液体培地に添加し、45℃で3～5日間増菌培養後、培養液をYSG寒天培地に塗布し、さらに45℃で3～5日培養する。出現してきた菌について、上記と同様に、温度差法やペルオキシダーゼ法により、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌であるか否かを判定している。

#### 【0018】

本発明の検出・識別法には、サンプルとしてYSG寒天培地で出現した菌や、増菌培養液中に存在する菌を供することができる。

#### 【0019】

なお、本明細書で使用する「検体」とは、有害菌アリサイクロバチラス・アシドテレストリスを含む可能性があり、本発明の検出・識別法の対象となるサンプルであるが、特に限定はない。例えば、果汁（原料）、果汁を含む飲料等を挙げることができる。また、本明細書で使用する「識別」とは、アリサイクロバチラス属菌の1種以上が存在する検体において、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌とその他のアリサイクロバチラス属菌を区別して、検出することを特に指す場合もあるが、一般的には複数の菌種のなかで検出対象であるアリサイクロバチラス属菌もしくはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌を識別することを指す。また、本明細書で使用する「判定」とは、検出した菌がアリサイクロバチラス属菌であるか否か、或いはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌か否かを判定することを指し、検出と同義に使用されることもある。

#### 【0020】

本発明で使用するLAMP法は、PCR法と異なり、増幅工程での温度調節（サイクル）を不要とし、一種類のDNA合成酵素を用いて、一定温度（等温）で増幅する遺伝子増幅法である（国際特許公開WO 00/28082号パンフレット、前掲）。



## 【0021】

本発明のアリサイクロバチラス属菌の16SrDNA遺伝子に特異的なプライマーは、その特定領域を標的として、ループを形成する2種類の内部プライマーと2種類の外部プライマーの計4種類のセット(FIP、F3、BIP、B3)として、設計する。増幅する遺伝子の特定領域は、100~500bp程度である。プライマーのオリゴヌクレオチドの核酸配列が決定されると、オリゴヌクレオチド自身の合成は、公知の手段、例えば、パーキンエルマー社製の自動DNA合成装置を用いて実施できる。

## 【0022】

本発明において、アリサイクロバチラス属菌に特異的なプライマーセットとして、例えば下記の1組のプライマーセット(A1プライマーセットという)を挙げることができる。ここで、アリサイクロバチラス属菌に特異的なプライマーとは、その菌の16SrDNA遺伝子の特定領域(141bp)を特異的に増幅可能なプライマーである。なお、16SrDNA遺伝子の全核酸配列を配列表の配列番号14に示す。

## 【0023】

A1-FIP

5' -TTGGGTTTCCTTCGGCACTGAGATACCCTGGTAGTCCACG-3' (配列番号1)

A1-BIP

5' -ATAAGCACTCCGCCTGGGGAGCCCCGTCAATTCCTTTG-3' (配列番号2)

A1-F3

5' -GTGGGGAGCAAACAGGATT-3' (配列番号3)

A1-B3

5' -ACATGCTCCACTGCTTGTG-3' (配列番号4)

本発明において、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌のみに特異的なプライマーセットとして、例えば下記の2組のプライマーセット(Alatプライマーセット、rAlatプライマーセット)を挙げることができる。ここで、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌のみに特異的なプライマーとは、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域(139bpもしくは146bp)を増幅可能であるが、他のアリサイクロバチラス属菌の遺伝子を増幅しないプライマーである。

## 【0024】

Alat-FIP

5' -ACAAGGAGCTTTCCTCTCCAAGAAGGCCTTCGGGTTGT-3' (配列番号5)

Alat-BIP

5' -TGAGACGGTACCGAGTGAGGACGCTTGCCCCCTACGTATT-3' (配列番号6)

Alat-F3

5' -CAAGCCTGACGGAGCAA-3' (配列番号7)

Alat-B3

5' -CCCAGTGATTCCGGACAA-3' (配列番号8)

rAlat-FIP

5' -AACACAAGTAGATGCCTACCCGCAATCTGCCTTTCAGACTGGA-3' (配列番号9)

rAlat-BIP

5' -TTGAAAGATGCAACTGCATCGCTCCGTTACCTACCAACTAGC-3' (配列番号10)

rAlat-F3

5' -CGGACGGGTGAGTAACACG-3' (配列番号11)

rAlat-B3

5' -TACGCATCGTCGCCTTGG-3' (配列番号12)

rAlat-LoopF

5' -ATTAGCACCCGTTTCCGAGT-3' (配列番号13)

検体中に存在するアリサイクロバチラス属菌および／またはアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の検出は、上記した3組のプライマーセットの少なくとも、1組のセットを用いて、LAMP法に従い、等温遺伝子増幅（通常60～65℃で15分～1時間）を行う。すなわち、検体から採取した菌株または飲料検体そのものを、適当な培地中で培養し、遠心分離等で集菌した後、公知の方法によって菌株のDNAを分離して、このDNAに対して、前記プライマーセットを用いて、増幅反応を行う。増幅したDNA増幅産物の有無は、LAMP法での簡易検出、或いは通常の電気泳動によって検出できる。前者の簡易検出には、1)増幅反応液の白濁による目視確認（国際特許公開 WO 01/83817号パンフレット）および2)蛍光インターカレーターの目視確認がある。いずれも、目視により増幅産物（標的遺伝子の存在）の有無を確認することができる。

**【実施例】****【0025】**

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

**【0026】****(実施例1) 既知菌株の16SrDNA遺伝子の増幅****(使用したプライマーセット)**

アリサイクロバチラス属菌用プライマーセット [A1プライマーセット: A1-FIP (配列番号1)、A1-BIP (配列番号2)、A1-F3 (配列番号3)、A1-B3 (配列番号4)] は、16SrDNA遺伝子の一部141bpを増幅する。アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌用プライマーセット1 [Alatプライマーセット: Alat-FIP (配列番号5)、Alat-BIP (配列番号6)、Alat-F3 (配列番号7)、Alat-B3 (配列番号8)] は、16SrDNA遺伝子の一部139bpを増幅する。また、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌用プライマーセット2 [rAlatプライマーセット: rAlat-FIP (配列番号9)、rAlat-BIP (配列番号10)、rAlat-F3 (配列番号11)、rAlat-B3 (配列番号12)、rAlat-LoopF (配列番号13)] は、16SrDNA遺伝子の一部146bpを増幅する。これらのプライマーセットによるアリサイクロバチラス属菌、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌の16SrDNA遺伝子の増幅、および近縁菌の16SrDNA遺伝子の増幅について検討した。供試菌株は、まとめて、各菌株に対する結果と共に表1に示した。

**【0027】****(ゲノムDNAの調製)**

アリサイクロバチラス属菌は、YSG寒天培地（酵母エキス: 0.2%、グルコース: 0.1%、可溶性デンプン: 0.2%、寒天: 1.5%、pH4.0）に植菌し、45℃で、2～5日間培養を行い、試験に供した。その他の供試菌は、ハートインフージョン寒天培地（栄研化学社製）に植菌し、37℃で、2～5日間培養を行い、試験に供した。DNA抽出液PrepMan（商標）Ultra（アプライド・バイオシステム社製）を用いて菌体からゲノムDNAを抽出した。

**【0028】****(LAMP法による遺伝子増幅)**

LAMP法による遺伝子増幅はLoopamp DNA増幅試薬キット（栄研化学社製）を用いて行った。試薬反応液に上記DNA溶液、および各プライマーセットを加え、遺伝子の増幅反応を行った。増幅反応は62℃で、60分間行った。

## 【0029】

## (増幅産物の検出)

増幅反応が進むにつれ、遊離してくるピロリン酸と、反応液中に存在するマグネシウムイオンとがピロリン酸マグネシウムを形成する。増幅が起こっている場合のみ反応液が白濁する。この白濁を観察することで、増幅産物の有無を判断した。また、一部の菌株については、反応液 1  $\mu$ l をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動にかけた。DNA のバンドは、エチジウムブロマイド溶液で 10 分間染色後、紫外線照射して観察し、確認した (図 1 ~ 3 に結果を示した)。

## 【0030】

Al プライマーおよび Alat プライマーについての増幅結果をまとめたものが表 1 である。

## 【0031】

【表 1】

| 供試菌株   | 増幅の有無    |            |
|--|----------|------------|
|  | Al プライマー | Alat プライマー |
| <i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> IF015310 | +        | -          |
| <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> JCM5260   | +        | -          |
| <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ID313-1   | +        | -          |
| <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ID313-3   | +        | -          |
| <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSM2498  | +        | +          |
| <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ID313-2  | +        | +          |
| <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ID313-4  | +        | +          |
| <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ID331-1  | +        | +          |
| <i>Bacillus coagulans</i> AHU1366                | -        | -          |
| <i>Bacillus coagulans</i> AHU1367                | -        | -          |
| <i>Bacillus coagulans</i> ID237                  | -        | -          |
| <i>Bacillus licheniformis</i> AHU1371            | -        | -          |
| <i>Bacillus licheniformis</i> ID351-4            | -        | -          |
| <i>Bacillus polymyxa</i> IAM1189                 | -        | -          |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> ID322-1            | -        | -          |

＋ : 増幅する      - : 増幅せず

NBRC: Biological Resource Center, Biotechnology Center, National Institute of Technology and Evaluation, Tsukuba, Japan

JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan

AHU: Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan

IAM: IAM Culture Collection, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Japan

DSM: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany

ID: サッポロビール分離株

### 【0032】

表 1 に示したように、Al プライマーセットを用いたとき、増幅産物は、アリサイクロバチラス属に属する全ての供試菌株に確認することができた。一方、Alat プライマーセットを用いたとき、増幅産物は、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス種に属する供試菌株のみに確認することができた。しかし、両プライマーセットとも、アリサイクロバチラス属以外の近縁菌の 16SrDNA 遺伝子増幅に由来する増幅産物は、確認されなかった。

### 【0033】

**(実施例2) 果汁から分離した菌株の識別**

オレンジ、リンゴ、パイナップル、梅などの果汁をYSG寒天培地（酵母エキス：0.2%、グルコース：0.1%、可溶性デンプン：0.2%、寒天：1.5%、pH4.0）中、45℃で、2～5日間培養して、分離した菌株を試験に供した。LAMP法による遺伝子増幅および、増幅産物の検出は実施例1と同様に行った。結果を表2に示した。

**【0034】**

（遺伝子解析による同定）

分離株の同定は16SrDNAの遺伝子解析により行った。実施例1に示した方法で、ゲノムDNAを調製した後、MicroSeq 500 16SrDNA キット（アプライド・バイオシステム社製）を用いて、分離株の同定を行った。

**【0035】****【表2】**

| 菌株    | A1 プライマー | Alat プライマー | 同定結果                      |
|-------|----------|------------|---------------------------|
| No. 1 | +        | +          | <i>A. acidoterrestris</i> |
| No. 2 | +        | +          | <i>A. acidoterrestris</i> |
| No. 3 | +        | —          | <i>A. acidocaldarius</i>  |
| No. 4 | +        | —          | <i>A. acidocaldarius</i>  |
| No. 5 | +        | +          | <i>A. acidoterrestris</i> |
| No. 6 | +        | —          | <i>A. acidocaldarius</i>  |
| No. 7 | +        | —          | <i>A. acidocaldarius</i>  |
| No. 8 | +        | —          | <i>A. acidocaldarius</i>  |
| No. 9 | +        | —          | <i>A. acidocaldarius</i>  |

+: 増幅する    -: 増幅せず

**【0036】**

表2に示したように、遺伝子解析の結果、分離した菌株は全てアリサイクロバチラス属に属する菌株であった。遺伝子解析による同定結果とA1プライマーを用いた識別結果とは良く一致しており、さらに、アリサイクロバチラス・テレストリス種と同定されたNo.1株、No.2株およびNo.5株のみにおいて、Alatプライマーによる増幅が観察された。

**【0037】**

（実施例3） 果汁飲料からのアリサイクロバチラス属菌の検出

*Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM2498を添加した市販濃縮リンゴ果汁飲料1ml（10cfu/ml）を、30mlのYSG液体培地と混合し、45℃で4～24時間静置培養した（増菌培養）。

**【0038】**

各培養時間におけるYSG培養液1.0mlを12,000rpmで5分間遠心し、菌体を回収した。菌体を200μlのTEバッファー（10mM トリス塩酸、0.1mM EDTA、pH8.0）に懸濁した後、遠心分離して菌体を洗浄した。洗浄した菌体を100μlのDNA抽出液PrepMan（商標）Ultra（アプライド・バイオシステム社製）に懸濁し、99℃で15分間加熱処理した後、12,000rpmで5分間遠心し、その上清をLAMP法用DNA試料溶液とした。

**【0039】**

上記の方法に従って調製したDNA溶液の1μlを、Alatプライマーを用いて遺伝子増幅を

行った。LAMP法による遺伝子増幅および、増幅産物の検出は実施例1と同様にして行った。

#### 【0040】

一方、各培養時間において、培養液の一部をYSG寒天培地の播種し、生菌数を測定した。増幅の結果と生菌数の測定値を表3に示した。

#### 【0041】

【表3】

|              | 増菌培養時間 (hr) |     |    |                 |                 |
|--------------|-------------|-----|----|-----------------|-----------------|
|              | 0           | 4   | 8  | 16              | 24              |
| Alatによる検出    | —           | —   | —  | +               | +               |
| 生菌数 (cfu/ml) | 0.3         | <10 | 40 | $1 \times 10^4$ | $6 \times 10^5$ |

生菌数: YSG 寒天培地で3日間 (45℃) 培養して測定 (cfu/ml)

#### 【0042】

表3に示したように、一晚程度の増菌培養を行うだけで、初発菌数1 cfu/ml以下 (YSG 液体培地における) のアリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌を、Alatプライマーを用いたLAMP法によって検出することができた。このように、短時間の増菌培養を行った後 (本実施例では16時間)、LAMP法により、目的遺伝子検出を行うことで、死菌の遺伝子を検出することなく、生菌を選択的に検出することができる。

#### 【0043】

「耐熱性好酸性菌統一検査法」 (果汁協会報、3月号、No.535、4-12、2003) によれば、この増菌培養に3～5日、アリサイクロバチラス・アシドテレストリスか否かを判定するのに、さらに3～5日必要なことから、本発明の検出方法を用いることで、検出・識別までの時間を大幅に短縮することが可能となった。

#### 【0044】

(実施例4) 迅速微生物検査装置 (RMDS-SPS) で出現した菌の識別

細胞内に存在するATPを利用して、微生物を迅速に検出するための装置としてRMDS-SPS (商標: ミリポア社・サッポロビール社製) がある。その装置で検出したコロニー (目視で見えない極微小コロニー) が、アリサイクロバチラス属菌か否かの識別の可能性を検討した。

#### 【0045】

Alicyclobacillus acidoterrestris DSM2498を添加した市販濃縮リンゴ果汁飲料1ml (10cfu/ml) をメンブランフィルターで濾過した。菌を捕捉したメンブランフィルターをYSG寒天培地に載せ、45℃で、5～8時間培養した (増菌培養)。培養後、RMDS-SPS装置を用いて検出した菌が存在するフィルター部位を切出し、2  $\mu$  lのDNA抽出液PrepMan (商標) Ultra (アプライド・バイオシステム社製) をフィルターに載せ、99℃で15分間加熱処理し、DNA抽出を行った。そのフィルターにAlatプライマーを用いたLAMP法で、遺伝子増幅を行った。LAMP法による遺伝子増幅および、増幅産物の検出は実施例1と同様にして行った。結果を表4に示した。

#### 【0046】

【表 4】

|       | 培養時間 (hr) |   |   |
|-------|-----------|---|---|
|       | 0         |   | 8 |
| 識別の可否 | ×         | ○ | ○ |

○: *A. acidoterrestris* と判定      ×: *A. acidoterrestris* と判定できず

## 【0047】

表 4 に示したように、迅速微生物検査装置 (RMDS-SPS) と組合せることにより、数時間の増菌培養を行うだけで、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌を、Alat プライマーを用いた LAMP 法によって識別することができた。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0048】

果汁飲料等の変敗事故の原因菌であるアリサイクロバチラス属菌（特に、アリサイクロバチラス・アシドテレストリス菌）を選択的、迅速、簡便に、識別、検出することが可能となった。

## 【0049】

したがって、本発明のプライマーセットおよびそれを用いるアリサイクロバチラス属菌などの検出方法は、食品、果汁入り飲料等の製造現場で製品の品質管理に役に立つ。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0050】

【図 1】 Al プライマーによる等温遺伝子増幅を行った結果を示す電気泳動図レーン M: マーカーレーン Bc: *Bacillus coagulans* ID237 レーン Pp: *Paenibacillus polymyxa* ID322-1 レーン Bl: *Bacillus licheniformis* ID354-1 レーン Aat: *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM2498 レーン Ac: *Alicyclobacillus cycloheptanicus* NBRC15310 レーン Aac: *Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260

【図 2】 Alat プライマーによる等温遺伝子増幅を行った結果を示す電気泳動図レーン M: マーカーレーン Ac: *Alicyclobacillus cycloheptanicus* NBRC15310 レーン Aac1: *Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260 レーン Aac2: *Alicyclobacillus acidocaldarius* ID313-1 レーン Aac3: *Alicyclobacillus acidocaldarius* ID313-3 レーン Aat1: *Alicyclobacillus cycloheptanicus* NBRC15310 レーン Aat2: *Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260 レーン Aat3: *Alicyclobacillus acidoterrestris* ID313-4 レーン Aat4: *Alicyclobacillus acidoterrestris* ID331-1

【図 3】 rAlat プライマーによる増幅等温遺伝子増幅を行った結果を示す電気泳動図レーン Am: *Alicyclobacillus mali* IAM14936 レーン Ap: *Alicyclobacillus pomorum* IAM14988 レーン Aap: *Alicyclobacillus acidiphilus* IAM14883 レーン Aat: *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM2498 レーン Ac: *Alicyclobacillus cycloheptanicus* NBRC15310 レーン Aac: *Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260 レーン Aac: *Alicyclobacillus acidocaldarius* JCM5260

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Sapporo Breweries Ltd. and Eiken Chemical Co. Ltd.

<120> Primers for detection of Alicyclobacillus strain

<130> JP03-1476SB

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

ttgggtttcc ttcggcactg agataccctg gtagtccacg

40

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

ataagcactc cgcctgggga gccccgtca attcctttg

39

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

gtggggagca aacaggatt

19

<210> 4



<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> primer

<400> 4  
acatgctcca ctgcttgtg 19

<210> 5  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

---

<220>  
<223> primer

<400> 5  
acaaggagct ttccactctc caagaaggcc ttcgggttgt 40

<210> 6  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> primer

<400> 6  
tgagacggta ccgagtgagg acgcttgccc cctacgtatt 40

<210> 7  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> primer

<400> 7  
caagcctgac ggagcaa 17

<210> 8  
<211> 18  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

cccagtgatt ccggacaa

18

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial sequence

---

<220>

<223> primer

<400> 9

aacacaagta gatgcctacc cgcaatctgc ctttcagact gga

43

<210> 10

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

ttgaaagatg caactgcatc gtcctgttac ctcaccaact agc

43

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 11

cggacgggtg agtaacacg

19

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 12

tacgcatcgt cgccttgg

18

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 13

attagcaccc gtttccgagt

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1514

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; alicyclobacillus

&lt;400&gt; 14

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc 60

gagcccttcg gggctagcgg cggacgggtg agtaacacgt gggcaatctg cctttcagac 120

tggaataaca ctcggaaacg ggtgctaata ccggataata cacgggtagg catctacttg 180

tggtgaaaga tgcaactgca tcgctgagag aggagcccg cgcgcattag ctagttgggtg 240

aggtaacggc tcaccaaggc gacgatgcgt agccgacctg agagggtgac cggccacact 300

gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg 360

gcgcaagcct gacggagcaa cgccgcgtga gcgaagaagg ctttcgggtt gtaaagctct 420

gttgctcggg gagagcgaca aggagagtgg aaagctcctt gtgagacggt accgagttag 480

gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca agcgttgtcc 540

ggaatcactg ggcgtaaagc gtgcgtaggc ggttgtgtaa gtctgaagtg aaagtccaag 600

gctcaacctt gggattgctt tggaaactgc atgacttgag tgctggagag gcaaggggaa 660

ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tgtggaggaa taccagtggc gaaggcgctt 720

tgctggacag tgactgacgc tgaggcacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780

|   |      |
|---|------|
| ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc taggtgttgg ggggacacac cccagtgccg   | 840  |
| aaggaaaccc aataagcact ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa actcaaagga   | 900  |
| attgacgggg gcccgcaaa gcagtggagc atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa    | 960  |
| ccttaccagg gcttgacatc cctctgaccg gtgcagagat gtaccttccc ttcggggcag   | 1020 |
| aggagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc   | 1080 |
| gcaacgagcg caacccttga tctgtgttac cagcacgtag aggtggggac tcacaggtga   | 1140 |
| ctgccggcgt aagtcggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc ctttatgtcc   | 1200 |
| <hr/>   |      |
| tgggctacac acgtgctaca atgggcggta caacgggaag cgaagccgcg aggtggagca   | 1260 |
| aaacctaaaa agccgttcgt agttcggatt gcaggctgca actcgcttgc atgaagccgg   | 1320 |
| aattgctagt aatcgcggtat cagcatgccg cggatgaatcc gtccccgggc cttgtacaca | 1380 |
| ccgcccgtca caccacgaga gtcggcaaca cccgaagtcg gtgaggtaac cgttatggag   | 1440 |
| ccagccgccg aaggtgggggt tgatgattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg  | 1500 |
| aaggtgcggt tgga   | 1514 |

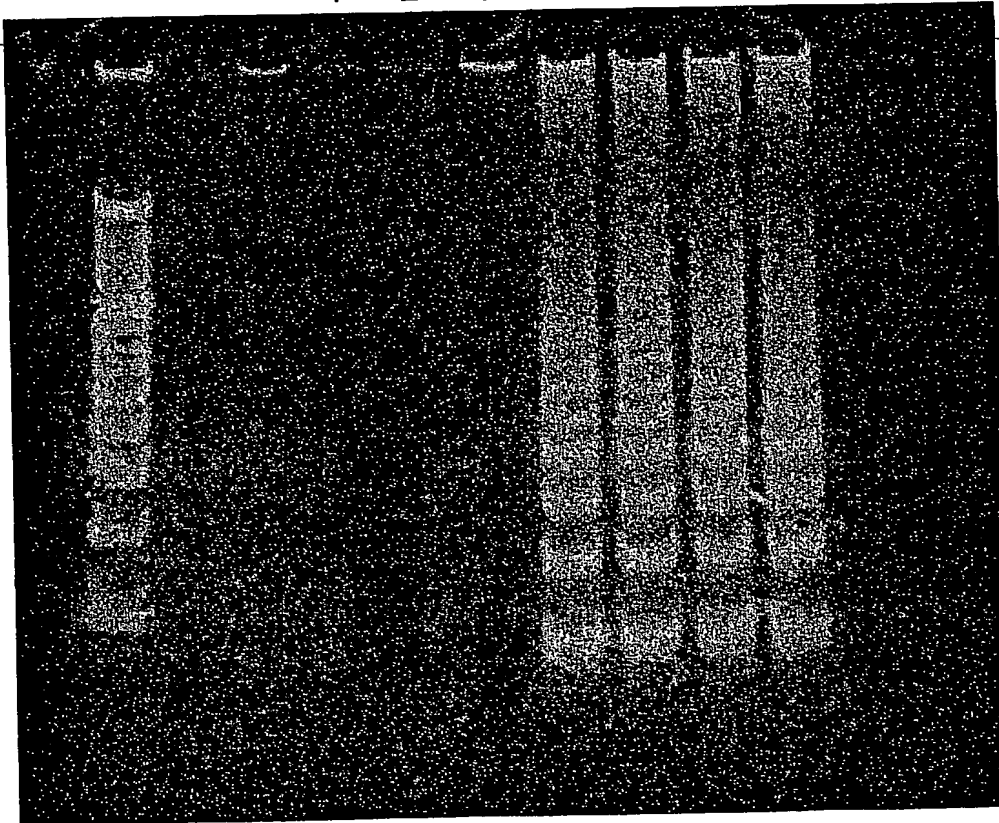
【書類名】 図面  
【図 1】

M Bc Pp B1 Aat Ac Aac



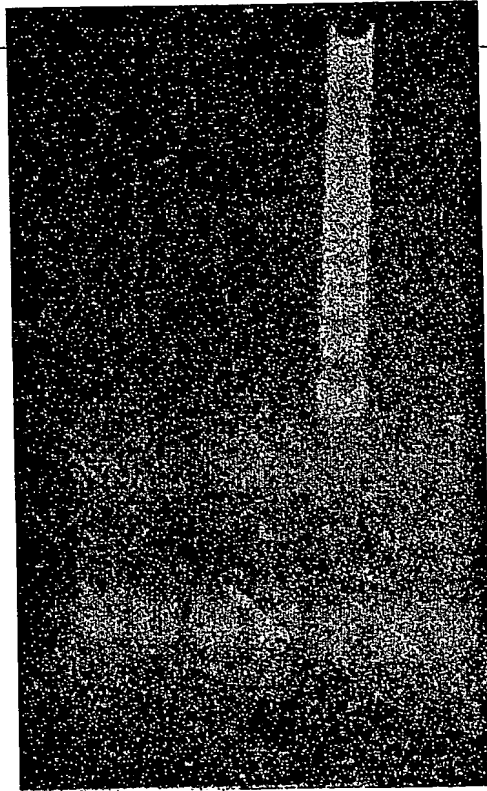
【図 2】

|   |    |     |     |     |     |     |     |     |
|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| M | Ac | Aac | Aac | Aac | Aat | Aat | Aat | Aat |
|   | 1  | 2   | 3   | 1   | 2   | 3   | 4   |     |



【図 3】

Am Ap Aap Ah Aat Ac Aac



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アリサイクロバチラス属に属する食品有害菌をより選択的に、迅速かつ簡便に検出する。

【解決手段】 アリサイクロバチラス属菌に特異的なプライマーを用いて、該アリサイクロバチラス菌の16SrDNA遺伝子の特定領域をLAMP法により増幅させ、該増幅産物の有無を確認して、アリサイクロバチラス属菌（特に、アリサイクロバチラス・テレストリス菌）を検出する。

【選択図】 なし



特願 2003-349772

出願人履歴情報

識別番号

[303040183]

1. 変更年月日

2003年 7月17日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号

氏名

サッポロビール株式会社

特願 2003-349772

出願人履歴情報

識別番号

[000120456]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区本郷1丁目33番8号

氏 名

栄研化学株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**